

**АО «Медицинский университет Астана»
кафедра фармацевтических дисциплин**

Тема: «Жидкостная хроматография»

Подготовила: Карашутова В.
203-фарм
Проверила: Арыстанова Т.А.

Астана, 2016

План:

- Понятие ЖХ;
- Оборудование
- Высокоэффективная жидкостная хроматография;
- Список неподвижных фаз;
- Механизм разделения
- Нормально-фазовая хроматография
- Обращенно-фазовая хр-я
- Разновидность детекторов
- Методика детекторов
- Используемые формулы в ЖХ
- Идентификация
- Количественное определение
- Контроль примесей
- Условия хроматографического анализа
- Источники

Жидкостная хроматография (ЖХ)

- Это метод хроматографического разделения, основанный на разности распределения веществ между двумя несмешивающимися фазами, в которой жидкость, являющаяся подвижной фазой, проходит через неподвижную фазу, находящуюся в колонке.

ЖХ основана на механизмах:



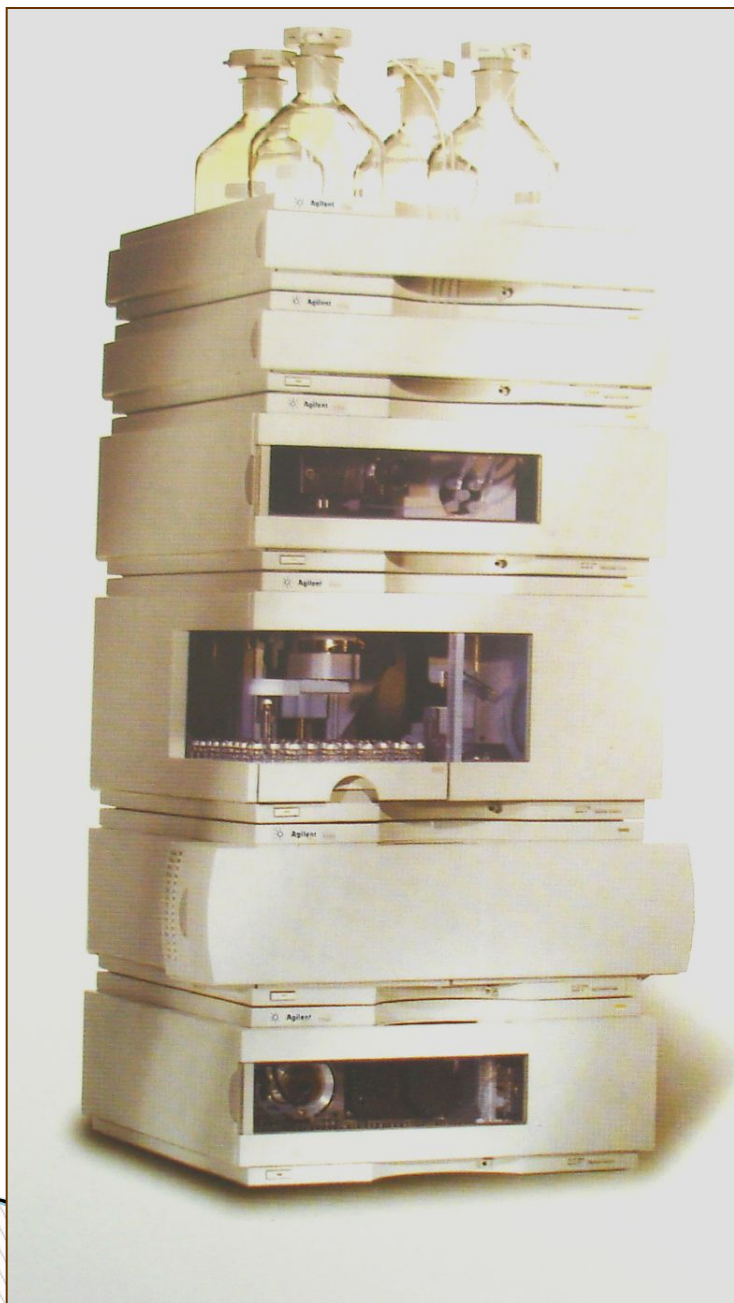
Оборудование:

Оборудование состоит из насосной системы, устройства ввода проб, *хроматографической колонки* (допускается использование термостата для колонки), *детектора* и *регистрирующего устройства* (интегратора и самописца).

Подвижная фаза, обычно подаваемая под давлением из одной или нескольких емкостей, протекает через устройство ввода пробы, колонку, а затем через детектор с заданной скоростью.



Один из наиболее распространенных и современных жидкостных хроматографов фирмы **Shimadzu**



**Блочный
жидкостной
хроматограф
Agilent 1100**

Насосная система

В ЖХ насосная система необходима для доставки подвижной фазы с постоянной скоростью потока.

Перепады давления должны быть сведены к минимуму, например, путем прохождения растворителя под давлением через демпферное устройство.

Система труб и соединений должны выдерживать давление, развиваемое насосной системой. Допускается использование в ЖХ насосов, оснащенных устройством для

«прокачки» пузырьков захваченного воздуха.

Микропроцессоры, представляющие собой контролируемую систему, подают подвижную фазу или постоянного (изократическое элюирование), или переменного (градиентное элюирование) состава в соответствии с задаваемой программой. В случае градиентного элюирования насосные системы доставляют из

нескольких резервуаров растворители, смешивание которых происходит либо при низком, либо высоком давлении, создаваемом насосами.

Устройство ввода проб (инжекторы)

Пробу раствора вводят в движущуюся подвижную фазу в верхнюю часть колонки или рядом с ней с помощью устройства ввода проб, работающего при высоком давлении.

Используют закрепленные петли и устройство с меняющимся объемом, которые действуют вручную или автоматически.

Заполнение петель в ручную снижает точность введения объема.

Колонки с внутренним диаметром менее 2мм часто относят к микроколонкам.

Температура подвижной фазы и колонки должна быть постоянной в течение анализа. Чаще всего разделение проводят при комнатной температуре, допускается нагревание колонки для повышения ее эффективности, но не более 60 градусов из-за возможности уменьшения потенциала неподвижной фазы или изменения состава подвижной фазы.

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ):

- ▣ Метод ВЭЖХ разработан в 1960-х гг. Ш. Хорватом (США) и, независимо от него, Г. Киркландом (Англия)
- ▣ -Это вариант ЖХ, когда по колонке с сорбентом проходит подвижная фаза под высоким давлением, в которой вещества растворяются лучше и быстрее продвигаются.

Используется для качественного и количественного анализа смесей органических веществ в следующих областях:

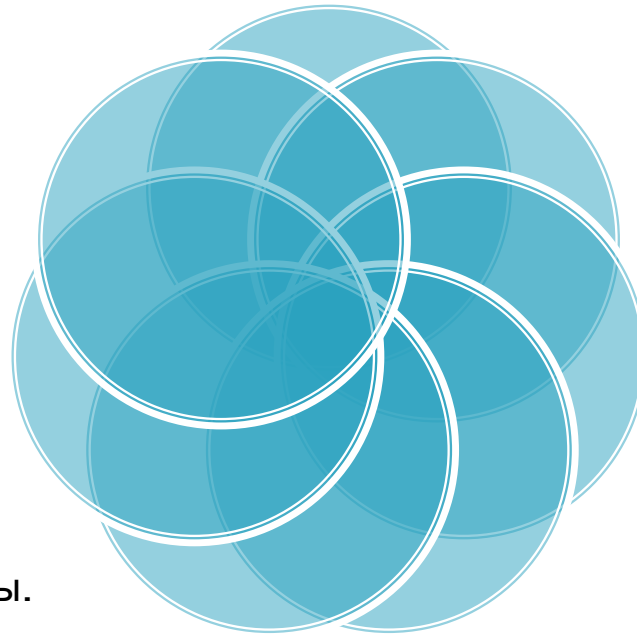
химическая
технология и
нефтехимия,

контроль качества
пищевых продуктов,
лекарств и др.

производство
лекарственных
препаратов,

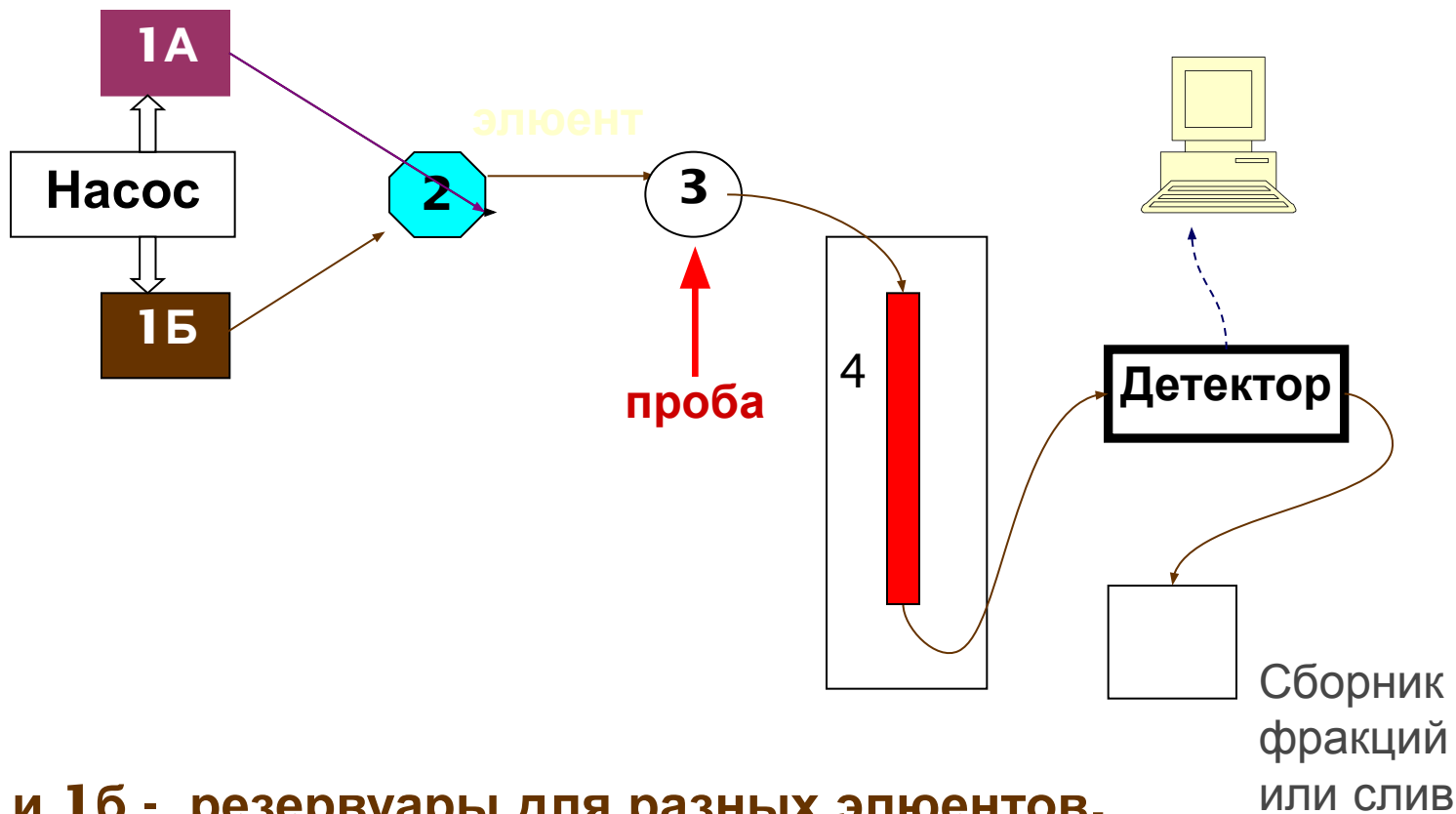
биохимические
исследования и
клинический анализ,

мониторинг
состояния
окружающей среды.



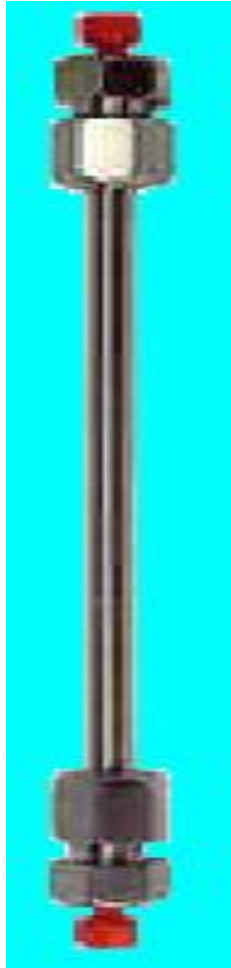
криминалистическая
экспертиза,

Принципиальная схема хроматографа для ВЭЖХ



1а и 1б - резервуары для разных элюентов,
2 - смеситель для градиентного элюирования,
3 - кран-дозатор,
4 - микроколонка с сорбентом

Колонки для ВЭЖХ

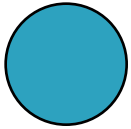


Длина колонки – до 25 см, внутренний диаметр – до 5 мм, внешний – 1-2 см. Материал – сталь + стекло. Некоторые колонки выдерживают давление до 1000 атм.

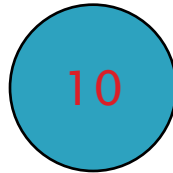
Набивка – модифицированный силикагель или оксид алюминия, сферические частицы диаметром 5 – 10 мкм.

Основной тип матриц в ВЭЖХ – силикагель

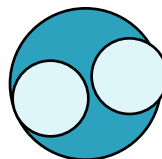
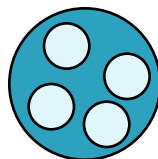
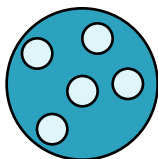
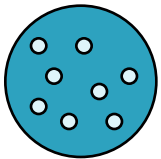
Сферичность



Размер частиц, мкм



Размер пор, А



Достоинства

- Отработанная технология синтеза
- Доступность и относительно низкая цена
- Большой диапазон свойств
- Механическая прочность

Недостатки

- Химическая активность ОН-групп на поверхности
- рН стабильность (2-9)
- Адсорбированная вода

Детекторы для ВЭЖХ

Тип детектора	Предел обнаружения, г/мл	Диапазон линейности сигнала	Селективность
Флуориметр	10^{-9} - 10^{-11}	10^5	Да
Кондуктометр	10^{-8} - 10^{-9}	10^5	Да
Спектрофотометр	10^{-7} - 10^{-8}	10^4	Да/Нет
Масс-спектрометр	10^{-6} - 10^{-7}	10^5	Нет
Рефрактометр	10^{-5} - 10^{-6}	10^3	Нет

Факторы, улучшающие разрешение пиков в методе ВЭЖХ

- Правильный выбор неподвижной фазы;
- однородность сорбента, его сферичность;
- однородность набивки колонки;
- увеличение длины колонки;
- уменьшение внутреннего диаметра колонки;
- правильный выбор подвижной фазы;
- использование градиентного элюирования;
- оптимальная скорость потока элюента;

По ГФ РК в качестве неподвижных фаз используют:

Используемые в нормально-фазовой ХР (разделение основано на разности в адсорбции и (или) массовом распределении)

• Полиэтиленифталат и графит
• Полиэтилентерефталат
• Диоксид алюминия
• Силикагель
• Полиамины

В ионно-обменной ХР (разделение основано на конкуренции между разделяемыми ионами и ионами, находящимися в подвижной фазе)

• Полиметакрилат
• Полистирол
• Поливинилпирролидон
• Полиакрилат
• Полиакриламид
• Полиэтиленифталат

В эксклюзионной ХР (разделение происходит в соответствии с размерами молекул)

• Полиметилметакрилат
• Полиэтиленифталат
• Полистирол
• Полиэтилентерефталат
• Полиэтиленифталат
• Полиэтилентерефталат
• Полиэтиленифталат

В обращенно-фазовой ЖХ (разделение основано на распределении молекул между подвижной и неподвижной фазами)

Для разделения энантиомеров (хиральная хроматография)

- Специальные хим. модифицированные неподвижные фазы, такие как, целлюлоза или производные амилоса, протеин или их модифицированные производные.
- носители, приготовленные из полимеров, кремнезема или пористого
- Специальные хим. модифицированные неподвижные фазы, такие как, целлюлоза или производные амилоса, протеин или их модифицированные производные.

Механизм разделения основан на использовании в качестве

Неподвижной фазы

- **Химически модифицированного кремнезема**

Подвижной фазы

- **Полярных растворителей** (соединения, молекулы которых обладают электрическим дипольным моментом. Для полярных веществ, в сравнении с неполярными, характерны высокая диэлектрическая проницаемость, повышенные температура кипения и температура плавления. Например: Вода, спирты и т.д.)

- На поверхности носителя, такого, как, например, кремнезем имеются *силанольные группы*, которые, взаимодействуя с различными силановыми реагентами, образуют ковалентно связанные силилированные производные, покрывающие различное число активных центров на его поверхности.

□ Природа функционально привитой фазы является важным параметром, определяющим разделительные свойства хроматографической системы. Наиболее часто используют следующие функционально привитые фазы:

Октил $-Si-[CH_2]_7-CH_3$

C8

Октадецил $-Si-[CH_2]_{17}-CH_3$

C18

Фенил $-Si-[CH_2]-C_6H_5$

C6H5

Цианопропил $-Si-[CH_2]_3-CN$

CN

Аминопропил $-Si-[CH_2]_3-NH_2$

NH2

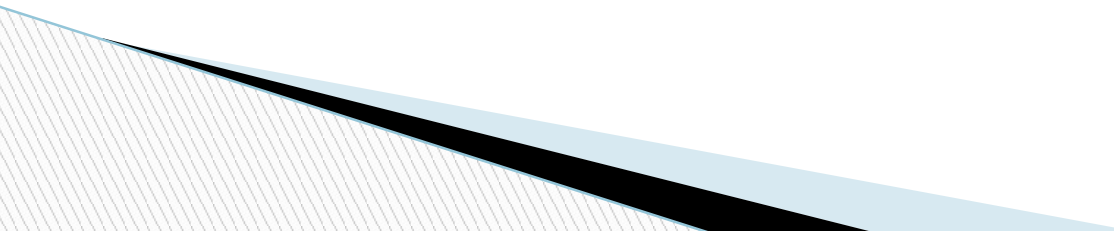
Диол $-Si-[CH_2]_3-O-CH(OH)-CH_2-OH$

O-CH(OH)-CH2-OH

Силикагель, являющийся носителем в обращенно-фазовых колонках, должен быть устойчивым в подвижных фазах при значении рН в области от 2,0 до 8,0 при отсутствии других указаний производителя.

Пористый графит и частицы полимерных материалов, таких, как, например, сополимер стирола с дивинилбензолом, устойчивы в более широкой области рН.

В определенных случаях в нормально-фазовой хроматографии применяют *неполярную подвижную фазу*, а в качестве неподвижной фазы:

- немодифицированный кремнезем,
 - пористый графит,
 - полярный химически модифицированный кремнезем с такими группами как, цианопропил или диол
- 

Частицы для большинства используемых неподвижных фаз имеют

Размер

- От 3 мкм
- 10 мкм

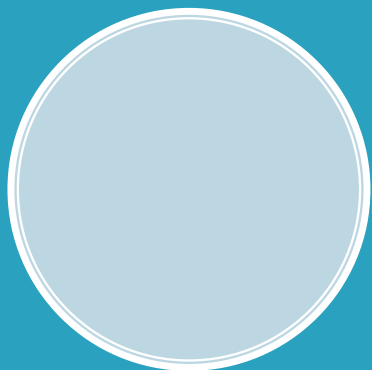
Форма

- Сферическая
- Неправильная

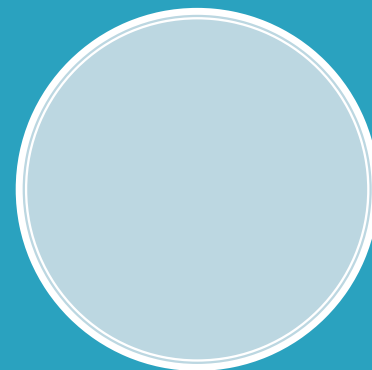
- Различная пористость
- Удельная поверхность

Данные параметры оказывают влияние на хроматографическое поведение неподвижных фаз

- В случае *обращенных фаз* дополнительным фактором являются природа неподвижной фазы и степень связывания активных центров, например, содержание углерода или эндкепирование (силилирование оставшихся силанольных групп). Наличие остаточных силанольных групп обуславливает размытость пиков, особенно основных веществ.



Для *нормально-фазовой хроматографии* применяют менее полярные растворители.



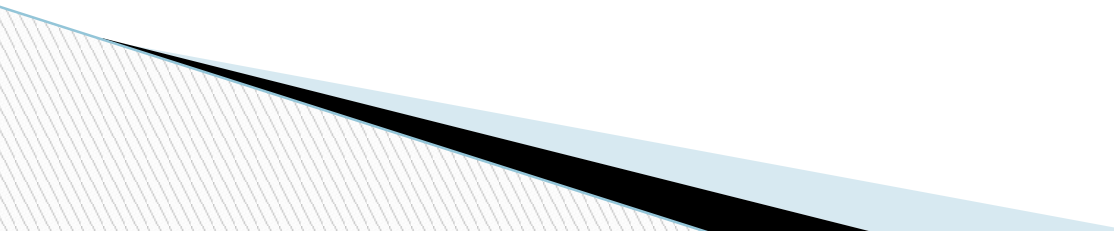
Присутствие воды в подвижной фазе следует строго контролировать для получения воспроизводимых результатов.



В обращенно-фазовой
ЖХ применяют водные
подвижные фазы

С органическими
модификаторами

БЕЗ них

- В качестве детекторов применяют спектрофотометры
 - В УФ
 - Видимой области, включающие диодный набор детекторов
 - Допускается использование:
 - Флуоресцентных спектрофотометров
 - Дифференциальных рефрактометров
 - Электрохимических детекторов
 - Масс-спектрометров
 - Светорассеивающих
 - Радиоактивных и других спец. детекторов
- 

Методика

- Колонку уравнивают с подвижной фазой и скоростью потока до установления устойчивого исходного состояния при комнатной температуре или температуре, указанной в частной статье. Готовят испытуемый раствор(ы) и раствор(ы) сравнения в соответствии с описанием в частной статье. Растворы не должны содержать твердых частиц.

Используя растворы сравнения, настраивают прибор и подбирают объемы вводимых проб, которые позволяют получить необходимый(адекватный) сигнал. Выполняют повторные введения для проверки сходимости сигнала и проверяют при необходимости число теоретических тарелок.

Вводят растворы и регистрируют результаты хроматографирования. Для проверки сходимости сигнала выполняют повторные введения. Определяют площади пиков анализируемых компонентов. В случае, если коэффициент симметрии, вычисленный, как описано ниже, имеет значение от 0.8 до 1,20, допускается проводить определение по высоте пиков. При использовании градиентного элюирования необходимо проводить определение по площадям пиков. При использовании внутреннего стандарта следует удостовериться, что ни один из пиков анализируемого вещества или его примеси не маскируется пиком внутреннего стандарта.

Из полученных значений вычисляют содержание определяемого компонента или компонентов. Если указано в частной статье, процентное содержание одного или нескольких компонентов анализируемой пробы определяют посредством вычисления процентной доли площади соответствующего пика или пиков к суммарной площади всех пиков, исключая пики растворителей или добавленных реактивов (метод внутренней нормализации). В этих случаях рекомендуется использование широкодиапазонного усилителя и автоматического интегратора.

Коэффициент симметрии пика

$$\frac{b_{0.05}}{2A}$$

Где

$b(0.05)$ -ширина пика на одной двадцатой высоты пика;

A -расстояние между перпендикуляром, опущенным из максимума пика, и передней границей пика на одной двадцатой высоты пика.

Коэффициент разделения ($R(s)$)

$$R_s = \frac{1.18 (t_{Rb} - t_{Ro})}{b_{0.5a} + b_{0.5b}}$$

$$t_{Rb} > t_{Ro}$$

где

t_{Rb} и t_{Ro} – расстояния вдоль базовой линии от точки ввода пробы до перпендикуляров, опущенных из максимумов двух соседних пиков в миллиметрах;

$b_{0.5a}$ и $b_{0.5b}$ – ширина пиков на половине высоты в миллиметрах.

При отсутствии других указаний в частной статье результаты анализа считаются достоверными, если коэффициент разделения для измеряемых пиков на хроматограмме больше 1.0.

Число теоретических тарелок (n) может быть получено из данных, полученных в изократическом режиме

$$n = 5.54 \left(\frac{t_R}{b_{0.5}} \right)^2$$

где

t_R — расстояние вдоль базовой линии от точки ввода пробы до перпендикуляра, опущенного из максимума пика анализируемого вещества в миллиметрах;

$b_{0.5}$ — ширина пика на половине высоты в миллиметрах.

Коэффициент емкости (коэф. распределения масс)

$$D_m = k' = \frac{\text{КВНФ}}{\text{КВПФ}} = K \cdot \frac{V_s}{V_m},$$

$$t_{Rb} > t_{Ro.}$$

где

КВНФ – количество растворенного вещества в неподвижной фазе;

КВПФ – количество растворенного вещества в подвижной фазе;

K – равновесный коэффициент распределения;

V_s – объем неподвижной фазы;

V_m – объем подвижной фазы.

Коэффициент емкости компонента может быть определен из данных хроматограммы по формуле:

$$D_m = k' = \frac{t_R - t_{R'}}{t_{R'}}$$

где

t_R — расстояние вдоль базовой линии от точки ввода пробы до перпендикуляра, опущенного из максимума пика анализируемого компонента в миллиметрах;

$t_{R'}$ — расстояние вдоль базовой линии от точки ввода пробы до перпендикуляра, опущенного из максимума пика неудерживаемого компонента в миллиметрах.

Отношение сигнал/шум (S/H)

$$S/H = \frac{2H}{h_n},$$

где

H – высота пика соответствующего компонента на хроматограмме, полученной для указанного раствора сравнения;

h_n – абсолютное значение наибольшей флуктуации шума базовой линии на хроматограмме холостого

раствора, наблюдаемое на промежутке, равном двадцатикратной ширине на полувысоте пика на хроматограмме раствора сравнения, размещенном равномерно вокруг места расположения пика.

Подходы к идентификации, количественному определению и контролю лекарственных веществ аналогичны методам газовой хроматографии



Идентификацию проводят одним из способов:

- Сравнение времен удерживания анализируемого вещества в испытуемой пробе и растворе сравнения;
- Сравнение относительных времен удерживания анализируемого вещества в испытуемой пробе и растворе сравнения;
- Сравнение хроматограммы испытуемой пробы с хроматограммой раствора сравнения или с хроматограммой, приведенной в частной статье.

(В большинстве случаев используют 1 способ.

2 способ используют при плохой воспроизводимости условий хроматографирования. 3 способ оптимален для препаратов растительного и животного происхождения)

Количественное определение

Проводят методами:

- ▣ **Абсолютной калибровки** (для испытуемого р-ра и р-ра сравнения рассчитывают средние значения площадей или высот пиков анализируемого в-ва. По полученным средним значениям рассчитывают концентрацию анализируемого в-ва в испытуемом р-ре)
- ▣ **Внутреннего стандарта** (для каждой хроматограммы рассчитывают отношение площади или высоты пика анализируемого в-ва к площади или высоте пика внутреннего стандарта. Полученные отношения усредняют для испытуемого р-ра и р-ра сравнения и по найденным средним значениям определяют концентрацию анализируемого в-ва в испытуемом р-ре)

Контроль примесей

Для контроля примесей используют следующие подходы:

- 1) Количественное определение примеси с использованием р-ра сравнения с известной концентрацией примеси (обычно в варианте абсолютной калибровки)
- 2) Способ внутренней нормализации
- 3) Сравнение с разбавленным р-м основного в-ва
- 4) Способ стандартных добавок

□ Результаты анализа считаются достоверными, если выполняются требования теста «Проверка пригодности хроматографической системы».

Данный тест обычно проводят с использованием р-в сравнения.

Условия хроматографического анализа

- Размеры хроматографической колонки и материал, из которого она изготовлена;
- ~тип неподвижной фазы и при необходимости ее коммерческую марку;
- ~размер частиц неподвижной фазы;
- ~при использовании предколонки те же сведения указываются для нее
- ~температуру колонки,
- ~скорость потока и состав подвижной фазы;
- ~в случае использования градиента-программу его изменения;
- ~тип детектора.

Источники:

- ▣ «Общая фармацевтическая химия» Т.А. Арыстанова
- ▣ Государственная фармакопея РК